

from the
second report.

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-277062

(43)公開日 平成6年(1994)10月4日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 15/10				
C 12 Q 1/68	A 7823-4B 9050-4B 9050-4B		C 12 N 15/ 00	A Z

審査請求 未請求 請求項の数28 O L (全 21 頁)

(21)出願番号	特願平5-225395	(71)出願人	592085104 エフ. ホフマンーラ ロシュ アクチエン ゲゼルシャフト F. HOFFMANN-LA ROCHE AKTIENGESELLSCHAFT スイス国, ツェーハー-4002 バーゼル, グレンツァハーシュトーラーセ 124
(22)出願日	平成5年(1993)9月10日	(72)発明者	ジャン ブルクハルト スイス国, ツェーハー-4312 マグデン, ゾンネンブラッツ 19
(31)優先権主張番号	02875/92-6	(74)代理人	弁理士 宇井 正一 (外4名)
(32)優先日	1992年9月11日		
(33)優先権主張国	スイス(CH)		

(54)【発明の名称】 血液試料中の核酸の增幅および検出

(57)【要約】

【目的】 本発明は酵素的増幅方法による血液試料からDNAまたはRNAの形の核酸の増幅方法に関する。

【構成】 本発明の方法は、他の方法では増幅すべき核酸を予備精製する必要がある血液試料の調製を全く行わず、そして反応混合物中に特定量の塩が存在するならば増幅方法に使う反応混合物中の該試料の比率が5容量%より大きいことを特徴とする。血液試料の比率並びに一価および/または二価イオンの塩濃度に依存して、増幅を行う反応混合物中の塩濃度は、適切であれば、適當な濃縮塩溶液の使用によって酵素必要条件に適合される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 酵素的増幅方法による血液試料からの核酸配列、DNAまたはRNAの増幅方法であって、増幅反応混合物中の5容量%以上である血液試料を、前記増幅を実施する条件下で前記増幅を実施するのに必要な試薬にさらすことを含んで成り、前記増幅試薬が少なくとも1つの塩を含んで成る方法。

【請求項2】 前記血液試料が増幅反応混合物の10容量%以上である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記反応混合物中の塩濃度が、増幅方法に使用する酵素に応じて、増幅反応中の酵素の活性を最大にするように調整される、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記増幅がポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により実施される、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 前記PCRに使用される酵素が耐熱性ポリメラーゼである、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 前記耐熱性ポリメラーゼがテルムス (*Thermus*) 属の細菌から単離されたポリメラーゼである、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 前記酵素がテルムス・アクアティカス (*Thermus aquaticus*) のポリメラーゼである、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 前記反応混合物が少なくとも1つのアルカリ金属の一価塩を含有する、請求項1に記載の方法。

【請求項9】 前記反応混合物が少なくとも1つのアルカリ土類金属の二価塩を含有する、請求項1に記載の方法。

【請求項10】 前記アルカリ金属の塩がK⁺およびNa⁺から成る群から選択される、請求項8に記載の方法。

【請求項11】 前記試料の量が約10容量%～約80容量%である、請求項1に記載の方法。

【請求項12】 前記試料が全血、血漿または血清である、請求項1に記載の方法。

【請求項13】 前記血液試料が抗凝固剤で処理されている、請求項12に記載の方法。

【請求項14】 前記抗凝固剤がヘパリンである、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 前記反応混合物中の一価イオンの塩濃度が約10～約160 mMである、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 前記反応混合物中の一価イオンの塩濃度が約10～約90 mMである、請求項15に記載の方法。

【請求項17】 前記抗凝固剤がクエン酸塩である、請求項13に記載の方法。

【請求項18】 前記反応混合物中の一価イオンの塩濃度が約30～約200 mMである、請求項17に記載の方法。

【請求項19】 前記反応混合物中の一価イオンの塩濃度が約60～約150 mMである、請求項18に記載の方法。

【請求項20】 前記試料の量が20容量%以上であり、そして前記塩がMg²⁺を含む、請求項17に記載の方法。

【請求項21】 前記Mg²⁺濃度が少なくとも3 mMであ

る、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 前記Mg²⁺濃度が約4.5～約21.5 mMである、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 前記抗凝固剤がエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) の塩である、請求項13に記載の方法。

【請求項24】 前記反応混合物中の一価イオンの塩濃度が約10～約135 mMである、請求項23に記載の方法。

【請求項25】 前記反応混合物中の一価イオンの塩濃度が約30～約80 mMである、請求項24に記載の方法。

10 【請求項26】 前記反応混合物中のMg²⁺濃度が約1.4 mM～約5.0 mMである、請求項24に記載の方法。

【請求項27】 前記試料が増幅前に凍結される、請求項12に記載の方法。

【請求項28】 血液試料中の標的核酸配列を増幅させるための改良されたキットであつて、約10～約80容量の試料容量に対して反応混合物中に約10～約200 mMの塩濃度を含んで成るように改良されたキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

20 【産業上の利用分野】本発明は、核酸の同定および血液試料からの核酸の増幅に関する。本発明の主題は、或る塩濃度を有する酵素的増幅方法による血液試料からの核酸配列、DNAまたはRNAの増幅方法である。この方法は、他の方法では増幅すべき核酸配列を予備精製することが必要な血液試料の準備を全く行わず、且つ増幅方法に用いる反応混合物中の試料の比率が5容量%以上、好ましくは10容量%以上であることを特徴とする。

【0002】

【従来の技術】生物学的研究や更に特別には診断医学において、核酸の同定および特徴付けの必要性が継続的に高まってきている。「核酸」とは、この場合、天然に存在する形であるかまたは実質的に任意の配列と長さの現代化学および生物学合成法により製造することができるようなデオキシリボース核酸 (DNA) とりボース核酸 (RNA) であると解釈すべきである。

【0003】分子生物学において血液から核酸を調製するのに使われている従来の方法は複雑であり、遠心、試料のフェノール／クロロホルム抽出または有機溶媒を使った核酸の沈殿といった段階を含み、これらは実質的消費を伴わない迅速で且つ潜在的に自動化可能である核酸の酵素的増幅には無駄である。そのような方法の最近の編集物は、V. N. Loparevら、J. Vir. Methods 34, 105-112 (1991) による「感染物質を同定するための全血または細胞系からの効率的で且つ単純なDNA抽出法 (An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell-lines to identify infectious agents)」およびP. S. Walshら、BioTechniques 10(4), 506-513 (1991) による「法医学的材料からのPCR型決定用DNAの単純な抽出のための媒質としてのChelex

40 100 (Chelex 100 as a medium for simple extraction

of DNA for PCR-based typing from forensic materia
l)」中に見つかる。

【0004】全血は反応混合物中に非常に少量、即ち1容量%で存在する時であっても、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を阻害することが報告されており、この理由はホルフィリン環から成るヘム誘導体であると考えられている（R. Higuchi, *PCR Technology*, H. Ehrlich編, Stochton Oress 1989, 「PCR用の試料の単純且つ迅速な調製（Simple and rapid preparation of samples for PCR）」の章, 31~38頁）。

【0005】Higuchi（前掲）によれば、PCR用の血液試料の細胞DNAを調製する方法は、フィコール勾配を使って単核血液細胞（MC）を単離または赤血球の溶解後に遠心により白血球を単離し、そしてMCをプロテイナーゼKと共にインキュベートすることである。消化後にプロテイナーゼKを95°Cで不活性化し、試料のアリコートをPCRに使用する。

【0006】Mercierらは、新鮮な血液または凍結した血液からの染色体DNAの種々の断片をPCR反応混合物中1~2容量%の濃度でPCR増幅することを記載している（Nucleic Acids Research 18, 5908 (1990)）。この方法では、血液試料を含む増幅溶液（Taqポリメラーゼは含まない）を3分間繰り返し95°Cと55°Cにした。この段階はその後の増幅を促進した。

【0007】Panaccioら（Nucleic Acids Research 19, 1151 (1991)）は、テルムス・テルモフィラス（*Thermus thermophilus*）からの耐熱性DNAポリメラーゼを使った全血からのDNAの増幅を記載している。彼らは、100 μlの反応混合物中4 μlの血液（4容量%）からのDNAはまだ増幅可能であるが、1容量%ほどの少ない血液はテルムス・アクアティカス（*Thermus aquaticus*）（Taq）からのDNAポリメラーゼを使った増幅を完全に阻害することを示している。

【0008】Beutlerら（BioTechniques 9, 166 (1990)）は、血液試料からのDNAのPCRにおける抗凝固剤の効果を詳細に記載している。核酸抽出物を使ってヘパリン血液から濃縮されたDNAでさえも増幅することが不可能であった。この方法で単離したDNAを使ったPCRを促進するDNAの精製方法（ヘパリナーゼIIでのDNAの処理を含む）が記載されている。EDTA血液から単離したDNAを使っても何ら問題なかった。

【0009】Israeliら（Nucleic Acids Research 19, 6501 (1991)）は、RNAからcDNAへの変換後の抽出によるヘパリン処理全血から単離されたRNAのPCRによる増幅を記載している。彼らは、PCRを実施する際の難点がヘパリンによるものであったことを証明している。単離したRNAをcDNAに翻訳する前にヘパリナーゼで処理した時にのみ、PCRが成功した。

【0010】Franchisら（Nucleic Acids Research 16, 10355 (1988)）もまた、ヒト血液から単離したゲノ

ムDNA試料を増幅する時にTaqポリメラーゼを使ったPCR方法の阻害を記載している。文献中では詳しく同定されなかった阻害剤は、該DNAを煮沸および濾過することにより除去することができた。

【0011】Ravaggiら（PCR Methods and Applications 4, 291-292 (1992)）は、PCRを使ったヒト血清からのHCV RNAの増幅を記載している。予備精製を行わずに逆転写酵素を使って直接該RNAを血清からcDNAに翻訳した。次いで約3容量%のDNAを含むアリコートをPCR混合物に導入した。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】本発明の1つの目的は、核酸の酵素的増幅方法、例えばPCR、特に血液を抗凝固剤で処理した時のPCRにおいて増加量の血液を直接使用するために、従来の技術の項目に記載した難点を克服することである。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明の主題は、酵素的増幅方法による血液試料からの核酸配列、DNAまたはRNAの増幅方法であって、増幅反応混合物中の5容量%以上である血液試料を、前記増幅を実施する条件下で前記増幅を実施するのに必要な試薬にさらすことを含んで成り、前記増幅試薬が少なくとも1つの塩を含んで成る方法である。この方法は、血液試料を増幅前に処理して標的核酸配列を単離または精製する必要がないという点で有利である。増幅反応混合物中の試料の量は5容量%以上、好ましくは10容量%以上である。

【0014】本発明は、血液から例えヒトの遺伝子配列を決定するため、および細菌由来の核酸、DNAもしくはRNAウイルスまたは真核生物の核酸を含む血液中の微生物の外来核酸を同定するためにも用いることができる。本発明の方法は、血液試料中の少量の感染性微生物の検出に特に有用である。

【0015】

【具体的説明】本明細書中の「血液試料」なる用語は、その起源を血液から誘導することができる任意の種類の試料を意味すると解釈すべきである。それは例え、液状の血液、例え全成分を有する新鮮な全血、または血漿であることができる。この用語は、例え血痕中に存在するような乾燥血液、凝固した血液もしくはそこから得られた血清、およびR. Ramanujanら（Clin. Chem. 39, 737 (1993)）により記載されたようなガラス化により安定化された血液をも包含する。

【0016】天然形態の血液は液体成分、いわゆる血漿と、血球成分、即ち血液細胞（赤血球、白血球、血小板等）とから成る。血漿は遠心後に残る抗凝固血液の部分である。それはアルブミンに加えて凝固剤と血漿タンパク質、糖、ミネラルおよび他の代謝産物を含有する透明な淡黄色液体である。血清は、凝固後に遠心分離によって得ることができ、もはやフィブリノーゲンのような凝

固因子を含まない血液の液体部分である。

【0017】成人の全血は、白血球を無視すれば、141.7～148.8 mMのナトリウムとカリウムを有する血漿55%と90.4～106 mMのナトリウムとカリウムを有する赤血球45%とから成る。ナトリウムとカリウムの平均値は約124 mMである (Documenta Geigy 1973, 560-564 頁)。

【0018】本明細書中で使用する「一価イオン」なる用語は、単一の正電荷を有する血液中に存在するイオンのみ、すなわち主として Na^+ および K^+ を意味する。塩化物含有物は無視される。対応して、「二価イオン」なる用語は、2つの正電荷を有するイオン、即ち主に Mg^{2+} および Ca^{2+} を意味する。

【0019】新鮮な血液は典型的には早期凝固を防止するために抗凝固剤で処理される。最もよく知られている抗凝固剤はヘパリン、クエン酸塩およびエチレンジアミン四酢酸の塩（この塩は以後EDTAと略記される）である。

【0020】或る血液試料収集用試験管の製造業者、例えばSherwood Medicalにより与えられる情報によれば、EDTA、クエン酸塩およびヘパリンは、次のように血液試料に添加される：EDTAは三カリウム塩として血液に添加される（血液10 mLあたり15%溶液 0.1mL）。これは、血液試料に約10 mMの追加カリウム濃度をもたらす。

【0021】クエン酸塩は三ナトリウム塩として血液に添加される（通常、血液4.5 mLあたり3.8 %溶液 0.5 mL）。これは血液試料に対して約36 mMのナトリウムの追加を与える。ヘパリンは血液1 mLあたり14.3 USP単位の最終濃度でリチウム塩として使用され、これは血液1 mLあたり約0.1 mgのヘパリンまたは5～15 μMの塩に相当する。

【0022】上記に基づくと、典型的な血液試料調製物はほぼ次の最終濃度の一価イオンを有する：(a) EDTA処理血液：135 mM；(b) クエン酸塩処理血液：160 mM；および(c) ヘパリン処理血液：124 mM。抗凝固剤として推奨される塩およびそれらの濃度に関する更なる詳細は、“N. S. Evacuated Tubes for Blood Sample Collection”、第3版(1991)、第11巻、第9号、6 頁(NCCLS Document A1-A3)において与えられている。

【0023】標的核酸増幅用の反応混合物中の一価イオン（主にカリウムイオンとナトリウムイオン）の最終濃度は、緩衝液、試料の容量、および全血中の抗凝固剤の種類に依存する。抗凝固剤の濃度は種々の製造元によって異なり得るので、一価イオンの濃度についての下記の記載では、血液のみからの塩の量（約124 mM）と、限定された塩濃度を有する溶液の添加から生じる追加の量だけが考慮されることに注意されたい。抗凝固剤からくる一価イオン濃度は無視されるだろう。例えばヘパリンの場合には、この値はとにかく取るに足らない。

【0024】本発明の方法によって増幅することができ

る核酸は、血液細胞中（例えばゲノムDNA、mRNA）や、血漿中および血清中に存在することができる。血漿または血清中では、核酸は細胞自身のDNAであるかまたは細胞溶解により遊離されたRNAであることができる、あるいはまた、細菌またはウイルスにより導入された外来核酸であることができる。或る種のRNAウイルスはDNAを転写せず、その場合にはRNAからDNAへの転写後に最初の増幅を行うことができる。下記の実施例により記載されるように、DNA段階のみでまたは新たなRNA中間体段階を経由して更なる増幅サイクルを行うことができる。

【0025】上述したように、他の核酸の混合物を含有する血液試料から特定の核酸を同定することは現在は困難である。非常に多量の異なる配列の存在下で特異的に作用することができる増幅方法を使う時さえも、或る標的核酸、例えば非反復遺伝子の標的核酸を増幅前に濃縮しなければならない。診断目的では、増幅方法は、所望の核酸配列、例えば合計 3.1×10^7 個の同じ大きさの別の配列の中に1回だけのヒト細胞にも存在する長さ20 100 bpのDNA断片、のみを選択的に増幅しなければならない（ヒトゲノムは 3.1×10^9 塩基対または 3.4×10^{-12} g のDNAから成る）。

【0026】現在では、最も良く知られている酵素的増幅方法であるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用できるためには、増幅前に試料を予備調製する比較的面倒な工程を実施することが必要である。通常使わなければならないこれらの追加の段階の目的は、核酸の予備精製により血液中の疑わしい阻害剤を除去または中和し、それにより着目の核酸配列の無妨害の増幅を促進することである。増幅すべき標的核酸のための試料調製操作は、試料が細胞、血漿／血清、または全血のいずれに由来するかに従って互いに異なる。

【0027】本発明より前には、PCR増幅は典型的には多量の血液成分を有する試料中の過剰な塩濃度により阻害された。計算の結果、約124 mMの一価イオンの平均平常濃度を有する血液がTaqポリメラーゼを使って行われる増幅に悪影響を及ぼすだろうことが示された。50 mM K⁺の調製反応混合物中の最終濃度を与えるように工夫された（例えば10×緩衝液として）常用のPCR緩衝液を考慮すると、10容量%の血液含量を有する反応混合物中の一価イオン（K⁺, Na⁺）の濃度は合計約63 mMであり、そして50容量%の血液含量では既に合計約113 mMである。上述したように、これらの値は試料中に使われた抗凝固剤の塩の寄与を含まない。

【0028】他方、PCRで最もよく使われるポリメラーゼであるテルムス・アクアティカス (*Thermus aquaticus*) のDNAポリメラーゼ (Taqポリメラーゼ) は約50 mM KClあたりに最適な合成を有する (PCR Technology 1989；第2章 : Taq DNAポリメラーゼ、D. H. Gelband著)。通常のPCR緩衝液が参考文献中に言及され

たKCl濃度を有するのはこのためである。75 mM KClより大きい濃度での常用の配列決定反応においてまたは200 mM KClより大きい濃度での10分間取り込みアッセイにおいては、Taqポリメラーゼの活性が全く検出できない。

【0029】驚くべきことに、本発明者らは、合計塩濃度を制御すれば、即ち反応混合物中の合計塩濃度を調整すれば、未処理の血液試料から直接核酸を増幅できることを見出した。高い容量の試料、例えば ≥ 10 容量%の血液試料が反応混合物中に存在すると増加量の初期核酸が明らかに利用可能である。血液試料の塩濃度、即ち血液によって増幅反応を行う反応混合物に与えられる一価および二価イオンの塩濃度を知ることによって、反応混合物中の塩濃度を、おそらく適當な濃縮塩溶液の使用により、予め決められた領域に維持しそして使用予定の酵素の必要条件に適合させることができる。周期表の第IAおよび第IIB族の元素の塩をこの目的に用いることができ、Na⁺、K⁺およびMg²⁺が好ましい。

【0030】反応混合物全体の中の血液試料の量に依存して、適當な濃縮塩溶液または希釈塩溶液を使って反応混合物中の塩濃度を容易に調節することができる。このことは、反応混合物中の高血液比率が存在すれば、もはや一価の塩が添加されないこと、即ち血液の比率が十分な程高ければ、試料中の一価または二価イオンの塩含量および緩衝能が或る状況下で特異的な増幅を促進するのに十分であり、即ち更なる塩溶液の使用は不要であることを意味する。

【0031】塩溶液は、塩の他に、緩衝剤および特定の増幅方法に必要および/または有利な他の成分も含むことができる。それらの成分は、例えば、Tricine (=N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチルグリシン])、Tris (=トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩酸塩)、イオン性または非イオン性界面活性剤、例えばTriton X-100 (アルキルフェニルポリエチレングリコール) またはTween (ポリオキシエチレンソルビトールモノラウレート)、および特定の増幅方法に使用する特定の酵素の活性に重要である別の元素 (例えばMnまたはCo等) の塩であることができる。

【0032】本発明はいずれの酵素に基づいた増幅方法にも適用することができる。多数の酵素的増幅方法が文献中に記載されている。1つの方法は、例えば特にEP-A 320308またはEP-A 336 731に記載されたようなリガーゼ連鎖反応 (LCR) である。この方法の詳しい説明および用途はWuおよびWallace, Genomics 4, 560-569 (1989) により記載されている。

【0033】別の酵素的増幅方法は、それぞれEP-A 310229およびEP-A 373 960に記載されたような転写経路経由のTAS法または3SR法である。他の記載はそれぞれGuatelliら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1874-1878 (1990) およびKwokら、Proc. Natl. Acad. Sci. U

SA 86, 1173-1177 (1989) 中に見つかる。それらの方法では、多数の酵素、例えばDNAおよびRNAポリメラーゼ並びに他の酵素が増幅工程において同時または連続的のいずれかで使われる。

【0034】別の増幅方法はRNAバクテリオファージQ β のレプリカーゼの使用に基づいたものである。この方法の操作は、例えばEP-A 361 983またはLizardiら、TIBTECH 9, 53-58 (1991) 中に記載されている。本発明の適用に好ましい他の酵素的増幅方法はポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) であり、これは米国特許第4,683,195号および同第4,683,201号に記載された方法の1つである。好ましい態様では、耐熱性ポリメラーゼを使って核酸が増幅される。

【0035】様々な耐熱性細菌由来の有用なポリメラーゼとしては、テルムス・アクアティカス (*Thermus aquaticus*) (米国特許第4,889,818号および同第5,079,352号)、テルムス・テルモフィラス (*Thermus thermophilus*) (WO 91/09950)、ピロコッカス・フリオサス (*Pyrococcus furiosus*) (WO 92/9688) およびテルモコッカス・リトラリス (*Thermococcus litoralis*) (EP-A 455 430) が挙げられる。それらの酵素は精製された天然形態または組換え形態のいずれかで有用であり、商業的に入手可能でもある。テルムス属から単離することができるポリメラーゼが好ましい。テルムス・アクアティカス (*Thermus aquaticus*) 由来の耐熱性DNAポリメラーゼ ("Taq" ポリメラーゼ) が本発明において特に好ましい。

【0036】RNAを最初にDNAに転写することによりRNAベースの核酸標的を増幅および検出するためにPCRを使うことができる。そのような方法は例えばWO 91/09944中に記載されている。この場合例えればいわゆる逆転写酵素を酵素として使うこともできる。DNAポリメラーゼ、例えばTaqポリメラーゼの逆転写酵素活性をこの目的に使うこともできる。別の二価イオン (この場合例えばMn²⁺) の対応する存在が、適用可能ならば、この活性を最大限に利用することを保証するだろう。

【0037】PCRまたはTASを使って実施する時の本発明の方法のプラクチスは様々な温度で使用され、便利には、変性、プライマーのハイブリダイゼーションおよび重合反応の温度を精密に制御することができる自動化方法において実施される。この目的に適する装置は米国特許第5,038,852号に記載されている。この種の装置は商業的に入手可能である。

【0038】核酸の酵素的増幅またはその後の検出を行うためのオリゴヌクレオチドは、既知の方法で、例えば固相合成法 [Oligonucleotide Synthesis: A practical Approach, IRL Press, Oxford, UK, M. J. Gait編 (1984)] により、調製することができる。多数のそのようなオリゴヌクレオチドが商業的に入手可能である。

【0039】上記に言及した酵素的増幅方法は全て、使用的する特定酵素の必要条件に最も良く合った特定の塩濃度および/または緩衝液を使用する。種々の方法において、増幅すべきDNAまたはRNAは、しばしば予備精製段階により試料中の他の成分から単離されるかまたは少なくとも高度に濃縮される。よって、酵素緩衝液は、試料により導入されるいすれかの添加剤に合わせて変える必要はない。しかしながら、そのような予備精製が行われる場合には、特に試料の汚染の危険性があるために、対応して作り上げた準備段階も必要である。

【0040】本発明をどのように操作するかを説明するために、PCRに関する血液試料中の標的核酸を増幅することを実証する。本発明の特別な特徴は、ヘパリン処理血液からの核酸の増幅に存する。現時点では、抗凝固剤としてヘパリンで試料を予め処理すると血液試料中の核酸のPCRが阻害されることが知られている。この事実は、DNA結合タンパク質は基質である核酸に対してよりもヘパリンに対してより大きい親和力を有するため、ヘパリンをDNA結合タンパク質の特異的阻害剤として使用した初期の酵素学の研究結果と一致する(T.A. Bickleら、Nucleic Acid Res. 4: 2561, 1977; J. Lewisら、Methods in Enzymology XXIX, 153, 1974)。

【0041】そのような前の研究結果は、反応混合物中のPCRによるヘパリン処理済血液試料からのDNAの増幅が不可能であるという偏見を当業者に植えつけただろう。しかしながら、本発明者らは、意外にも、高い血液含有率(例えば≥10容量%)から非常に高い血液含有率(例えば≥50容量%)ではDNAの増幅が可能であることを発見した。これは常用のPCR緩衝液を使った場合でも可能である。

【0042】即ち常用のPCR緩衝液中のKCl濃度(約50 mMのKCl)を、試料成分により導入される塩濃度に合わせて特別に変える必要はない(例えば実施例2を参照のこと)。別の選択肢は、試料の塩含有率が非常に高い時は緩衝液を使って塩の追加量を中和することである。反応混合物中の一価イオンの塩濃度は約10~160 mMである。好ましくは、一価イオン濃度は約10~90 mMである。

【0043】本発明のもう1つの特別な特徴は、EDTA処理血液からの核酸の増幅である。この種類の血液では、PCR緩衝液中50 mM KClの通常濃度を使うと、高められた量(約30容量%から上)の血液試料を用いて特異的なDNA合成を全く行うことができない。これは、約13.5 mMの一価イオンの最大塩濃度に相当する(それぞれ実施例1の表1、実施例2の表2を参照のこと)。

【0044】血液成分の影響を防ぐために予め精製されているDNAを基質として使った時でさえも、PCR酵素に対する塩の効果が認められる。反応混合物中10 mM KCl以上でのみ所望の標的核酸の特異的増幅が可能である(実施例1、表1)。相応して、例えば20容量%より

高いEDTA処理血液成分では、試料自体が約25 mMの一価イオンを提供しているため反応混合物へのKClの添加は不要である(表1)。結果として、EDTA処理血液からのDNAまたはRNAの増幅のためには、反応混合物中の一価イオンの塩濃度が10~135 mM、好ましくは30~80 mMであるべきである。

【0045】本発明の更に別の目的は、クエン酸塩加血液からの核酸の増幅である。抗凝固剤としてクエン酸塩で処理された血液を酵素的増幅の試料材料として使った10時、試料濃度に依存して異なる結果が得られる。例えば、50 mM KClを含む常用緩衝液をPCRにおいて使う場合、反応混合物中約20容量%までの試料濃度で増幅が可能である。

【0046】しかしながら、最適化されたマグネシウム濃度の場合には一般的により一層高いKCl濃度が得策であり、これは例えばPCR緩衝液を使って供給することができる。例えば、50容量%までおよびそれ以上の濃度を有する血液試料を増幅するためには、反応混合物中100~150 mMの追加のKCl濃度が適当である(実施例2)。これはまた、試料中の約70 mM以上の一価イオン濃度にほぼ該当する。従って、反応混合物中30~200 mMの一価イオンの塩濃度が酵素的増幅に必要とされる。好ましくは、約60~約150 mMの一価イオンの塩濃度が使われる。

【0047】クエン酸塩加血液では、ある状況下では二価イオンの濃度を適合させることが有利な場合があることが認められる。効率的なPCRのために、例えば、特に反応混合物中に非常に高い血液濃度(例えば≥20容量%)が存在する時、Mg²⁺の量を反応混合物中1.5~2 mMの正常値よりも高めるべきである。典型的には3 mM Mg²⁺より高い濃度が必要であり、この濃度は損害を与えることなく40 mMほどに高くすることができる。従つて、Mg²⁺濃度が臨界最小値より上であることを前提として、Mg²⁺濃度の選択は相当自由である。

【0048】血液中のMg²⁺濃度を無視すると、血液試料中に抗凝固剤としてEDTAが存在する時、反応混合物中のMg²⁺濃度が非常に重要である。約0.35~0.4 mMのMg²⁺が10容量%のEDTA処理血液により、約1.75~2.0 mMのMg²⁺が50容量%のEDTA処理血液により、そして約3.5~4.0 mMのMg²⁺が80容量%のEDTA処理血液により結合される。従つて、EDTAに結合するMg²⁺の量は常に等モル量である。

【0049】しかしながら、好結果の増幅には遊離Mg²⁺濃度が必要であるため、反応混合物中の結合したMg²⁺を考慮に入れなければならない。最適なPCRのためには1 mMより高い遊離Mg²⁺が存在しなければならない。遊離Mg²⁺濃度が1 mM以下であれば、多くて50%の最大可能増幅収率しか得られない。上限は約20 mMの遊離Mg²⁺である。それより高い値は最適より下の増幅収率を生じる。

【0050】最適なPCRのためには、10容量%のEDTA

処理血液の存在下では1.4 mMのMg²⁺濃度が必要最小濃度であることがわかり、50容量%のEDTA処理血液の存在下では3.0 mMのMg²⁺が必要最小濃度であることがわかり、そして80容量%のEDTA処理血液の存在下では5.0 mMのMg²⁺が必要最小濃度であることがわかった。それらの数値の中で特に驚くべきことは、80容量%ほどの高い濃度のEDTA処理血液量の遊離Mg²⁺濃度を、何ら前処理なしに増幅用の反応混合物として使用できることである。

【0051】種々の抗凝固剤で処理された10~50容量%の濃度の未精製の血液試料を有する反応液中でのDNA * 10

反応液中の試料濃度 (容量%)	10%	20%	30%	40%	50%
EDTA血液	50	25	0	0	0
ヘパリン血液	70	50	10	0	0
クエン酸加血液	100	100	80	50	50

【0053】効率的増幅を保証する追加の段階として、試料貯蔵の性質によって既にこれを行ってしまったならば使用前に血液試料を凍結することができる。増幅を増加させる別の可能なやり方は、まず試料のみまたは調製した反応混合物を熱循環器中で加熱と冷却により数回変性させることである。約85~95℃への加熱と約40~60℃への冷却による約5~20回のそのようなサイクルが十分である。

【0054】温度はそれぞれのレベルに短時間にのみ維持することが必要であり、1~2分で十分である。しかしながら、維持時間はそれより長くても短くてもよい。増幅用の成分(プライマー、トリホスフェート、酵素)を有する混合物は既に含まれているか、または保護するためにそれらの変性サイクル後にのみ酵素を添加することができる(例えばPCR混合物として)。

【0055】試料の変性後の酵素の添加は、例えば、酵素が感熱性であるTASのような等温増幅方法を使用する時に必要である。実際の増幅前のこの種の準備は、従来技術において様々な類似の方法で使用されている。例えば、Mercierら(前掲)は、事前の反復熱変性がその後のPCRを改善することを記載している。

【0056】この変性は、どの場合でも酵素的方法(例えばPCR、LCR)がDNA増幅に変性段階を必要とするならば、一般的増幅反応の最中の幾つかの追加のサイクルにより簡単に行うことができる。試料または反応混合物の前処理のこの変更は、全ての血液試料に一般的に適用することができる。

【0057】試料の予備凍結または加熱による増幅効率の増加は、PCR阻害剤の中和により起こるのではなくて細胞またはウイルスの溶解の改善により起こると思われる。従ってPCRの開始前に核酸が遊離されて増幅試薬に一層近づきやすくなる。

【0058】下記の本発明の説明は、標的核酸の増幅方法としてPCRをそして酵素としてTaqポリメラーゼを

* の増幅用に最適化されたMgCl₂濃度の場合に反応混合物中にPCR緩衝液により供給される追加のKCl濃度(mM)は、次の表に与える結果をもたらした。この表は、例えば、反応混合物中の試料濃度を後述のようにして増加させるにつれて、添加されるPCR緩衝液の一価イオン(ここでは例えばKClによる)の最適濃度がどのように変化するかの概要を与える。

【0052】

【表1】

※使用した特定の選択下で行われる。標的含有試料は全血、血漿または血清であることができる。本発明はまた、Taqポリメラーゼ以外の幾つかの他のポリメラーゼ(DNAまたはRNAポリメラーゼ)、例えばテルムス・テルモフィラス(*Thermus thermophilus*)、テルモコッカス・リトラリス(*Thermococcus litoralis*)またはピロコッカス・フリオサス(*Pyrococcus furiosus*)由来の上述した耐熱性ポリメラーゼのうちの1つの使用も期待する。各場合、特に酵素に依存して、反応混合物中の一価および/または二価イオンの濃度の個々の適合が必要かもしれない。

【0059】幾つかの他の酵素の手順についての詳細は実施例6に与えられる。試験する酵素の操作の範囲は、約10~160 mMの一価イオンの濃度範囲内(これはTaqポリメラーゼに関して前に記載した濃度でもある)且つヘパリン処理試料を使った時、高い血液濃度(例えば≥10容量%)と非常に高い血液濃度(例えば≥40容量%)のところである。本開示を鑑みれば、他のポリメラーゼについての特定の限界を発見することは当業者にとって比較的単純なことである。上記に論じたのと同様な考察が、他の酵素、例えば標的がRNAでありそして増幅方法がPCRまたはTASである時に使われる様々な逆転写酵素に適用される。

【0060】次の実施例は上述した本発明を更に説明するためであってそれを限定するためのものではない。新規方法により提供される効率的増幅が実施例3と11に示され、そしてその再現性が実施例4に示される。新規方法の他の可能な利用についての証拠は、実施例5の非常に多量の血液の分析および実施例8の乾燥血液試料の分析により与えられる。実施例12は未精製の血清および血漿試料からのPCRによるRNA標的の増幅の証拠を提供する。

【0061】

【実施例】

本明細書中で使用および報告するPCR条件に関する一般的観察

特記しない限り、全ての反応は $50\mu\text{l}$ の合計容量で、いわゆる「反応混合物」中で実施した。その中の試料濃度が高いため、必要な塩を含有する、対応して非常に濃厚な $10\times$ PCR緩衝液を使った（特定のPCR緩衝液の組成については下記の項目2を参照のこと）。

【0062】また、ヌクレオシド三リン酸、プライマー、緩衝液およびポリメラーゼを含有する標準的PCR混合物を使った。特記しない限り、テルムス・アクアティカス (*Thermus aquaticus*) 由来のDNAポリメラーゼを使った。

【0063】

1) 反応混合物 $50\mu\text{l}$ は次のものから成了た：

- (a) $10\times$ 濃縮PCR緩衝液 $4.5\mu\text{l}$
- (b) PCR混合物 $5.0\mu\text{l}$
- (c) 必要な試料容量 (μl)
- (d) 加熱滅菌済再蒸留水 適量で $50\mu\text{l}$ にする。

【0064】2) PCR緩衝液(A)の組成

(1) いわゆるLシリーズの $10\times$ PCR緩衝液は次のものを含んだ：

- $50\text{ mM Tricine (pH 8.8)}$ (25°C)
- 15 mM MgCl_2
- 0.5% Tween 20 (ポリオキシエチレンソルビトールモノラウレート) および
- 様々な濃度のKCl :

緩衝液 $10\times L0 = 0\text{ mM KCl}$

緩衝液 $10\times L1 = 100\text{ mM KCl}$

緩衝液 $10\times L2 = 200\text{ mM KCl}$

...

緩衝液 $10\times L15 = 1500\text{ mM KCl}$ 。

【0065】(2) L×Mシリーズの $10\times$ 緩衝液はLシリーズに対応するが 15 mM MgCl_2 の代わりに 150 mM MgCl_2 を含んだ。例えばL×Mシリーズの $10\times$ PCR緩衝液は次のものを含んだ：

- $50\text{ mM Tricine, pH 8.8}$ (25°C)
- 150 mM MgCl_2
- 0.5% Tween 20

• 次のような種々の濃度のKCl :

緩衝液 $10\times L0M = 0\text{ mM KCl}$

緩衝液 $10\times L1M = 100\text{ mM KCl}$

緩衝液 $10\times L2M = 200\text{ mM KCl}$

...

緩衝液 $10\times L15M = 1500\text{ mM KCl}$

【0066】(3) $10\times T$ 溶液は次のものから成了た：

- 15 mM MgCl_2
- 0.5% Tween 20

(Tricine、TrisまたはKClを全く含まない)

【0067】3) 増幅用のPCR混合物(B)の組成：

• 100 mM 溶液として各dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

$0.5\mu\text{l}$

- 対応する $10\times$ PCR緩衝液 $0.5\mu\text{l}$
- 各プライマー ($50\mu\text{M}$) $0.5\mu\text{l}$
- DNAポリメラーゼ 1.25~2.5 単位
- 水 適量で $5\mu\text{l}$ の最終容量にする。

【0068】特記しない限り、テルムス・アクアティカス (*Thermus aquaticus*) 由来のDNAポリメラーゼを使った。有利には、 $10\times$ PCR緩衝液 (A) $4.5\mu\text{l}$ を使って段階1) に従った増幅を実施し、試料容量 (1

10 (c)) を加熱滅菌済 H_2O (1(d)) で $45\mu\text{l}$ に満たした。試料を必要により熱変性せしめた。PCRの開始の直前にPCR混合物(b) $5\mu\text{l}$ を加えた。変性前に反応混合物を2滴 (30~40 μl に相当) の鉛油により被膜した。

【0069】4) DNA増幅のためのサイクルあたりの熱循環器条件は次のようにあった：

段階1 93°Cで30秒 (DNA鎖の分離)

段階2 X°Cで30秒 (プライマーのハイブリダイゼーション)

20 段階3 72°Cで90秒 (ポリメラーゼ反応)

上記温度変化 (段階1~3) の各々の前に20秒を置いた。従って1サイクルは3分30秒要した。通常合計約35~40サイクルが運転された。

【0070】多くの実験では、PCR前に試料を熱変性させた。変性サイクルについての熱循環器条件は下記のようであった：

段階1 90°Cで90秒

段階2 50°Cで90秒

【0071】典型的には変性のために20サイクル行った

30 が、幾つかの場合には5サイクルのみ行った。変性サイクル後、試料を室温に戻し、PCR混合物を添加し、記載のようにして標的核酸を増幅せしめた。

【0072】下記の項目5) に記載したプライマーには次のハイブリダイゼーション温度 (上記の段階2のX°C) を用了：

HLAプライマー GH26/27 : 60°C

第IX因子プライマー JR3/JR4 : 55°C

B型肝炎プライマー MD122/MD123 : 50°C

風疹プライマー Ru2/Ru3 : 60°C

40 【0073】

5) PCRプライマーの配列と増幅される断片のサイズ

a) HLA DQ α 遺伝子 (242 塩基対)

GH 26 : GTG CTG CAG GTG TAA ACT TGT ACC AG (配列番号1)

GH 27 : CAC GGA TCC GGT AGC AGC GGT AGA GTT G (配列番号2)

(プライマーと配列についてはH. Ehrlichら、*PCR Protocols, Acad Press.*, 261-271, 1990を参照のこと)。

【0074】b) 第IX因子遺伝子 (234 塩基対)

50 JR 3 : AGG ACC GGG CAT TCT AAG CAG TTT A (エクソン

D) (配列番号3)

JR 4 : CAG TTT CAA CTT GTT TCA GAG GGA A (配列番号4)

(プライマーと配列についてはJ. Reissら、Blut 60, 31-36, 1990を参照のこと)。

【0075】c) B型肝炎 (151塩基対)

MD 122 : CTC TCA ATT TTC TAG GGG GA (配列番号5)

MD 123 : AGC AGC AGG ATG AAG AGG AA (配列番号6)

それらのプライマーはB型肝炎ウイルスの長さ153 bpの断片を增幅する。プライマーMD122はHBVゲノムのbp 267-286にあり、プライマーMD123はbp 401-420にある(配列のナンバリングはH. Okamotoら、J. Gen. Virol. 67, 2305-2314, 1986に従った)。

【0076】d) 風疹 (321塩基対)

Ru 2 : TGC TTT GCC CCA TGG GAC CTC GAG (bp 1990-20

13) (配列番号7)

Ru 3 : GGC GAA CAC GCT CAT CAC GGT (bp 2290-2310)

(配列番号8)

(プライマーの配列についてはEggerding F. ら、J. Clin. Microbiol. 29, 945-952, 1991を参照のこと)。

【0077】

6) 使用するDNAおよびRNAポリメラーゼ

a) テルムス・アクアティカス (*Thermus aquaticus*)

由来のTaqポリメラーゼ: 20mM Tris (pH 8.0), 1mM EDTA, 1mM DTT および50%グリセリン中5単位/ μ lとしてのSuper Taq (Stehelin Switzerland)。

【0078】b) テルモコッカス・リトラリス (*Thermococcus litoralis*) 由来のDNAポリメラーゼ: Vent

(Biolabs New Enblad の商標) , 100mM KCl, 0.1mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH 7.4), 1mM DTT, 0.1 %Triton X-100, 100 μ g/mlのBSA および50%グリセロール中100単位/ml。

【0079】c) ピロコッカス・フリオサス (*Pyrococcus furiosus*) 由来のPfu DNAポリメラーゼ (Stratagene) : 50mM Tris-HCl (pH 8.2), 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 0.1 %Tween 20, 0.1 %NP-40および50%グリセロール中2500単位/ml。【0080】d) テルムス・テルモフィラス (*Thermus thermophilus*) 由来のrTth DNAポリメラーゼ (Perkin Elmer) : 100mM KCl, 20mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, 0.5 %Tween 20および50%グリセロール中2500単位/ml。

【0081】e) モロニーマウス白血病ウイルス由来の逆転写酵素 (BRL) : 20mM Tris-HCl, 1mM DTT, 0.01% NP-40, 0.1mM EDTA, 0.1M NaCl および50%グリセロール中200単位。

【0082】7) 増幅生成物の分析

増幅後、血液試料を12,000 gで5分間遠心し、その後で残渣5~7 μ lをアガロースゲルに適用した。 ≥ 40 容積%の全血を含む試料を遠心前に30 μ lの水で希釈した。

2%アガロースゲル上での電気泳動後に臭化エチジウムで染色することによってアンプリコンを同定した(これはアンプリコン感受性同定方法ではない)。よって弱いPCR結果は陰性と評価される。

【0083】実施例1: KC1 依存性のPCR

EDTA処理血液を使った最初の実験は、変性後に容量で10%の血液を有する反応液中の染色体DNA断片の特異的増幅が可能であることを示す。Taqポリメラーゼの臨界KCl濃度を決定する試験を、線形放射能取込みアッセイ (D. GelfandによるChapter 2: Taq DNA Polymerase, PCR Technology, Stockton Press 1989, Henry Ehrlich編を参照のこと) の代わりにPCRを使って繰り返した。精製DNAまたは20容積%の変性EDTA処理血液を基質として使った。

【0084】10 μ lの変性EDTA処理血液または20 ngの精製DNAを用いて、HLA遺伝子DQ α の断片をPCR緩衝液中0.0mM ~ 150mMのKCl濃度において増幅せしめた。緩衝液の他の成分は一定に維持した。血液試料はPCR前に熱循環器中で20サイクルで変性せしめた。アンプリコンの合成は35サイクルにおいて行った。次いで7 μ lの生成物をアガロースゲル上での電気泳動により分離し、臭化エチジウムで染色した。HLA遺伝子DQ α の長さ242 bpのアンプリコンの量を測定した。すると一価イオンの濃度がTaqポリメラーゼによる合成の効率および特異性の決定的要因の1つであることがわかった。下記のKCl値は、試料は無視されるのだからPCR緩衝液中の塩の濃度を指すのであって反応混合物中の合計KClを反映するのではない。

【0085】精製DNAの場合にはアンプリコンは10mM ~ 150mM KClの濃度で検出され、そして20容積%の血液の場合には0 ~ 110mM KClの濃度で検出が可能であった。最大合成は、精製DNAについては約70 ~ 80mM KClのところで、20容積%血液については0mMと50mMの間で起こった。

【0086】(精製DNAを含む) 反応混合物中40mM KCl以下の濃度では、Taqポリメラーゼは異なる長さの非特異的配列を合成する傾向があり、これはアガロースゲル上のDNAスメアとして現れる。この非特異的配列のバックグラウンドは、緩衝液中40mM KClでは弱いが、 ≤ 30 mM KClでは非常に顕著であり、所望の特異的合成を明らかに妨害した。

【0087】この非特異的DNA合成(「バックグラウンド」)は基質として精製DNAを使った場合のみ検出可能であった。20容積%の血液では、血液溶液の塩濃度は試験した全てのKCl濃度において反応の特異性を保証するのに十分であり、増幅をまだ観察することができた。過剰のKCl濃度はアンプリコン合成を減少させ、20容積%の血液の存在下での150 mM KClはPCR増幅を完全に阻害した。

【0088】20容積%の血液中の特異的合成は、PC

R緩衝液中 KClの不在下だけでなくTricine またはTris の不在下でも可能であった(表2)。この場合、PCR 緩衝液を、MgCl₂とTween 20のみを含有する溶液Tで置き換えた(この溶液の組成は「PCR条件に関する一般的観察」を参照のこと)。従って、PCR混合物中の血*

* 液濃度が十分に高ければ、試料の一価イオンの塩含量と緩衝能が特異的DNA合成をもたらすのに十分である。

【0089】

【表2】

**表2
KCl 依存性のPCR**

KCl (mM)	T	L 0	L 1	L 3	L 5	L 7	L 9	L 11	L 15
緩衝液									
基質:									
精製DNA	NT	NT	+/U	+/U	++	++	++	++	+
EDTA処理血液	++	++	++	++	++	++	++	+	-

++ : 非常に良好または良好な増幅
 + : 弱い増幅
 - : 検出できない増幅
 U : 非特異的DNA合成
 NT : 試験せず

【0090】実施例2:変性血液またはヘパリン、EDTA もしくはクエン酸で処理した血液の存在下でのPCR この実施例では、異なる塩濃度における5~50容量%の変性血液の存在下での増幅の効率を試験する。Taq ポリメラーゼによるDQ α 配列の増幅を再び測定した。

【0091】種々の起源の特定濃度の血液を種々の塩濃度を有する50μl 反応液中で変性せしめた。その後で各試料中のDQ α 特異的断片を40サイクルに渡りPCR増幅せしめた。2.5~25μl の血液(全反応容量の約5~50容量%に相当する)の存在下でPCRを実施した。アガロースゲル上での残渣7μl の電気泳動後、臭化エチジウムによりアンブリコンを同定した。PCR緩衝液の完全組成は実施例1において記載されている。アッセイの際のL \times M緩衝液の最終Mg²⁺濃度は、Lシリーズの緩衝液の通常の1.5 mMの代わりに15 mMであった。結果を表2に要約する。

【0092】a) ヘパリン処理血液

ヘパリン処理血液は、異なるKCl濃度に対して最小の反応感度を有することがわかった。特異的DNA合成は、L5緩衝液の使用では5~50容量%の血液の存在下で、そして溶液T(上記の2)(3)では10~50容量%の血液の存在下で達成された。40容量%と50容量%の血液では、L5緩衝液処理後よりもT溶液処理後の方がより多量のアンブリコンが認められた。このことは、一価イオンの不在下で増幅がより一層効率的であったことを示す。どの増幅においても妨害バックグラウンド(望ましくない合成)は全く観察されなかった。

【0093】b) EDTA処理血液

Taq ポリメラーゼの活性に対するKCl含量の影響はEDTA

※処理血液を用いるとより明白に認められる。L5緩衝液中では5~30容量%の血液、そしてT溶液中では10~50容量%の血液の特異的DNA配列の増幅が可能であった。T溶液中20容量%未満の血液レベルでは非特異的DNA合成が起きた。5容量%の血液では非特異的バックグラウンド合成だけが起り、特異的合成は全く検出できなかつた。DQ α アンブリコンの最大合成は、L5緩衝液では約10容量%の血液、そしてT溶液では約30容量%の血液である。

【0094】c) クエン酸塩添加血液

Taq ポリメラーゼは、クエン酸塩加血液の存在下ではEDTA処理またはヘパリン処理血液の存在下とは全く異なつて振る舞う。L0緩衝液とT溶液のいずれを用いても全く合成は不可能であった。L5緩衝液では5容量%と10容量%の血液中で増幅が可能であり、20容量%の変性血液中では非常に弱かつた。比較的多量の血液中での合成は、高MgCl₂およびKCl濃度を使った時に可能であつた。

【0095】100mM KClと15mM MgCl₂を含むL10M緩衝液では、5~50容量%の血液の存在下でアンブリコンが形成された。L5M緩衝液中では20~50容量%の血液の存在下で増幅が観察された。L0M緩衝液中では40容量%と50容量%のクエン酸塩加血液の存在下で増幅が観察された。比較的少量の血液の存在下での最後の2つの緩衝液では非常に強い望ましくないバックグラウンド合成が観察された。

【0096】この実施例は、PCRによる特異的DNA増幅が、上記の汎用される3つの抗凝固剤の全てにおいて、Taq ポリメラーゼと適当な緩衝液を用いて5~50容

量%の変性血液の存在下で可能であったことを示す。ヘ

パリン処理血液からの増幅反応が異なる濃度の一価イオ

ンに対して最低の感受性であり、最も特異的な合成を提 *

* 供することがわかった。

【0097】

* 【表3】

表3

5 ~50容量%の変性させたヘパリン、EDTAまたは
クエン酸塩処理血液の存在下でのPCR

	PCR混合物中の血液の濃度(容量%)					
	5	10	20	30	40	50
<u>ヘパリン処理血液</u>						
0.0mM KCl (T)	-	++	++	++	++	++
50mM KCl (L 5)	++	++	++	++	++	++
<u>EDTA処理血液</u>						
0.0mM KCl (T)	-/U	+/U	++	++	++	++
50mM KCl (L 5)	++	++	++	+	-	-
<u>クエン酸塩添加血液</u>						
0.0mM KCl (T)	-	-	-	-	-	-
0.0mM KCl; 15mM MgCl ₂ (L 0 M)	-/U	-/U	-/U	+/U	++/U	++/U
50mM KCl (L 5)	++	++	+	-	-	-
50mM KCl; 15mM MgCl ₂ (L 5 M)	-/U	+/U	++/U	++	++	++
100mM KCl (L 10)	++	++	-	-	-	-
100mM KCl; 15mM MgCl ₂ (L 10M)	++	++	++	++	++	+
150mM KCl; 15mM MgCl ₂ (L 15M)	++	++	++	+	+	-

T : 通常の5.0mM Tricine を含まない

- : 特異的増幅が全く検出されず

+ : わずかに検出可能なアンブリコン

++ : 良好~非常に良好なアンブリコンの検出

U : 非特異的DNA合成

【0098】表3は、反応混合物中100mM KClと15mM MgCl₂の濃度を与えるL10M緩衝液が、クエン酸塩加血液からのDNA-PCR増幅に適当であることを示す。必要 MgCl₂濃度を実施例2 Aにおいてより精密に限定する。

【0099】実施例2 A : クエン酸塩加血液中のPCRのためのMgCl₂濃度の最適化

HLA-DQ α 配列を、種々のマグネシウム濃度において2人(AとB)のクエン酸塩加血液のそれぞれ10 μ lおよび25 μ lから増幅せしめた。反応液は、0.05%Twee

※n, 5mM Tricine (pH 8.8) および50mM KClと20容量%のクエン酸塩加血液を含んだ。100mM KClと50容量%濃度のクエン酸塩加血液(試料1~7)、および80mM KClと50容量%のクエン酸塩加血液(試料8~11)を含む溶液も試験した。試料中のDNAを変性せしめた後、合計40回の増幅サイクルを実施した。他の点では、この試験の

40 実施と評価は上記実施例2に記載のものと同様であった。結果を下の表4に示す。

【0100】

* 【表4】

表4

PCR混合物中のクエン酸塩加 血液の濃度(容量%)	20%		50%	
	A	B	A	B
試料	MgCl ₂ (mM)			
1	1.5	-	-	NT
2	2.5	-	-	-
3	3.5	+	+	-
4	4.5	++	++	-
5	5.5	++	++	-
6	6.5	++	++	+
7	7.5	++	++	++
8	11.5	++	++	++
9	15.5	++	++	+
10	21.5	++	++	+
11	41.5	-	-	+

記号は表2と同じ意味を有する。

【0101】最適MgCl₂濃度は、試料の起源およびサイズに依存して4.5～21.5 mMに見つかった。

【0102】実施例3：全血中でのDNA試料のPCR增幅の効率の測定

成人の血液1 μlは4000～9000(平均5000)個の白血球を含む。実施例2に示されるように、3000個の細胞のゲノム材料にほぼ相当する20 ngの精製DNA(6.8 pgのDNA/二倍体細胞)が、PCRを使って明らかに目に見える量のアンブリコンを合成するのに十分である。白血球の定量的溶解があれば、ゲノムDNAを最初にPCRに適当な基質に変換し、そして未精製の血液試料の成分による増幅反応の阻害が全くないならば、全血1 μlが効率的アンブリコン合成に十分であろう。

【0103】従って、PCR用の新規試料調製の効率を*

*決定するための実験を次のように考案した。ヒトEDTA処理血液を、DNAがHLAプライマーGH26およびGH27と交差反応しないEDTA処理ヒツジ血液で希釈した。この実験では、凍結し変性させたEDTA処理ヒトおよびヒツジ血液各10 μlを、未希釈のまま種々の希釈率の両方において上述のPCRアッセイに使った。ヒトHLA遺伝子DQαに特異的であるプライマー対GH26とGH27を使ってL2緩衝液中で40サイクルに渡り増幅を行った。結果を下の表5に要約する。40増幅サイクルでは50個ほどの少数のヒト細胞が検出可能なアンブリコンバンドに十分であることがわかった。

【0104】

【表5】

表5

試料(ヒト血液： ヒツジ血液の希釈率)	PCR混合物あたり のヒト白血球数	アンブリコン合成
全部ヒト血液	50,000	++
1:10	5,000	++
1:100	500	++
1:10 ³	50	+
1:10 ⁴	5	-
1:10 ⁵	0.5	-
全部ヒツジ血液	-	-

記号は表2と同じ意味を有する。

【0105】実施例4：異なるヒトからの20容量%および40容量%の変性血液中でのPCR

※20容量%または40容量%の血液中でのPCRによるDN
A断片の増幅方法を、小グループの異なる試料において

調べた。10のEDTA処理血液、5つのヘパリン処理血液および4つのクエン酸塩処理血液試料からのDNAを、最適条件下でDQ α 特異的PCRプライマーを用いて効率的に増幅せしめた。増幅は、様々なヒトの10 μ lおよび20 μ lの変性血液それから50 μ lの反応液中で40サイクルに渡り増幅を行った。

【0106】PCR緩衝液は、EDTA処理血液とヘパリン処理血液にはL0 [5mM Tricine (pH 8.8), 100mM KCl, 15mM MgCl₂] * * * * *

*および0.05% Tween]、そしてクエン酸塩加血液にはL10 [5mM Tricine (pH 8.8), 100mM KCl, 15mM MgCl₂および0.05% Tween]であった。結果を下表6に与える。全ての試料が陽性であった。いずれのアッセイにおいてもTaqポリメラーゼは著しくは阻害されず、非特異的配列の妨害増幅は全くなかった。

【0107】

【表6】

表6

異なるヒトからの20容量%および40容量%の変性血液中でのPCR

PCR混合物中の血液の濃度(容量%)	20%	40%
a) <u>EDTA処理血液</u>		
ヒト1	++	++
ヒト2	++	++
ヒト3	++	++
ヒト4	++	++
ヒト5	++	++
ヒト6	++	++
ヒト7	++	++
ヒト8	++	++
ヒト9	++	++
ヒト10	++	++
b) <u>ヘパリン処理血液</u>		
ヒト11	++	++
ヒト12	++	++
ヒト13	++	++
ヒト14	++	++
ヒト15	++	++
c) <u>クエン酸塩添加血液</u>		
ヒト16	++	++
ヒト17	++	++
ヒト18	++	++
ヒト19	++	++

++ : 非常に目に見える量のアンプリコン

【0108】実施例5: 大規模反応におけるPCR

しばしば非常に低濃度で血液中に存在する感染性微生物の同定において特に注目されるのは、PCRアッセイにおいて特定配列を特異的且つ効率的に増幅することができる最大外来DNA/RNA量である。

【0109】血液中では核不含有のまたはDNA不含有の赤血球と核を含む白血球との間で区別が行われる。単核血液細胞(MZ)が白血球の約3分の1を構成する。成人の血液1 μ l中の平均含量は約5000個の白血球または血液60 μ l中100,000個のMZである。

※【0110】例えばHIV-DNAの同定のためには、PCRは通常約50,000~1,000,000個のMZを有する100 μ lの反応混合物容量において実施される。これは約340~680 ngのDNAに相当する(二倍体細胞あたり6.8 pgの含量と仮定して)。混合物あたり約1 μ lのDNAの上限は通常大きくは超過しない。というのは、外来DNAの濃度が過剰であると特異的アンプリコン合成が減少するためである(M. Abbottら、J. Infect. Disease 158: 1158-1169, 1988)。

※50 【0111】4,000,000個以上のMZの存在下で特異的

に配列を増幅させるための条件が発見された。PCR混合物あたりの試料容量を増加させる1つの単純なやり方が大規模PCRに存し、この場合反応容量は50-100μlから約500μlに増加される。500μlの大規模反応に関する実験は、50μl混合物を使ったものと同じ反応器と同じ熱循環器を使って実施した。反応成分の比率は変わらなかった。

【0112】PCR混合物の組成：

- ・dATP, dCTP, dGTPおよびdTTP (10mM溶液) 各5μl
- ・対応する10×PCR緩衝液 5μl
- ・各プライマー (50μM) 5μl
- ・Taqポリメラーゼ 12.5単位 (2.5μl)

【0113】反応混合物の組成：

- ・10×PCR緩衝液 45μl
- ・試料 100～400μl
- ・適量のH₂Oで467.5μlにする。

【0114】実施例1に指定した条件下で20サイクルにおいて試料を変性せしめ、その後各反応液に32.5μlのPCR混合物を添加した。大規模反応においてDQαを同定するのに使った熱循環器プログラムは次の通りであった：

段階1	93°Cで3分
段階2	60°Cで3分
段階3	72°Cで3分

* 各温度変化の間に20秒の間隔を置いた。従って1サイクルは10分間かかり、サイクル数は40であった。

【0115】大規模法を使ってHLA遺伝子DQαからの242 bp断片を増幅した。PCRを500μlの反応容量で行い、100～400μlの変性ヘパリン処理血液を含んだ。通常の50μl混合物とは異なり、幾つかの大規模反応では30～40μlの鉱油の代わりに80μlの鉱油を使って反応液を被膜した。他の点では、50μl PCR混合物と500μl PCR混合物は同じ相対比率の種々の反応成

10 分を有した。

【0116】表6は、5人の異なる提供者からの200μlのヘパリン処理血液の増幅の結果を要約する。各試料を使ってDQαアンブリコンの効率的且つ特異的合成が達成された。

【0117】500μlのPCR大規模反応液中40容量%濃度の試料では、200μlの血液が約1×10⁶個の白血球と約6.8μgのDNAを含んだ。それらのうちの約3分の1の0.4×10⁶個が単核細胞である。

【0118】より多量の血液、即ち250～400μl（これは50～80容量%に等しい）をヘパリン処理血液試料と共に実験的に使った。すると表7の(b)に見られるように、好結果に増幅された。

【0119】

* 【表7】

表7

大規模反応におけるPCR

(a) T溶液中のPCR：5人からの200μlのヘパリン処理血液

大規模PCRにおけるヘパリン血液の濃度=40容量%

血液提供者1	++
血液提供者2	++
血液提供者3	++
血液提供者4	++
血液提供者5	++

(b) L0緩衝液中のPCR：100～400μlのヘパリン処理血液

大規模PCRにおける ヘパリン血液の濃度(容量%)	20%	40%	60%	80%
------------------------------	-----	-----	-----	-----

提供者1	++	++	++	++
------	----	----	----	----

記号は表2と同じ意味を有する。

【0120】実施例6：テルムス・アクアティカス以外の3種の細菌由来の耐熱性DNAポリメラーゼを用いた変性全血からのDQαアンブリコンの合成

前述の実施例は全てTaqポリメラーゼを用いて変性全血からDNAを増幅せしめた。従って異なる起源の3種のDNAポリメラーゼについてDQα断片の増幅を試験し

※た。

【0121】Taqポリメラーゼはテルムス・アクアティカス (*Thermus aquaticus*) から単離される一方、Pfuポリメラーゼはピロコッカス・フリオサス (*Pyrococcus furiosus*) に由来し (Stratagene) 、VentRポリメラーゼはテルモコッカス・リトラリス (*Thermococcus lit*

oralis) に由来し (New England Biolabs) そして Tth ポリメラーゼはテルムス・テルモフィラス (*Thermus thermophilus*) に由来する (Perkin-Elmer)。

【O 1 2 2】10容量%および40容量%のヘパリン処理血液それを各酵素に付随の緩衝液中で変性せしめた。その後 HLA 遺伝子の242 bp断片を増幅せしめた。3種の酵素全てについて10容量%または40容量%の全血の存在下でアンプリコンが効率的に形成する条件を次のようにして確かめた。即ち、Pfu および Vent については酵素製造元の PCR 緩衝液中そして rTth については L 9 中での 5 μ l または 20 μ l の変性ヘパリン処理血液のホットスタート (hot start) 増幅、50 μ l の反応容量。

【O 1 2 3】Pfu を使って血液不含有の増幅により負の対照を実施した。即ちヘパリン処理血液 5 μ l を 5 μ l の H₂O により置き換えた。ホットスタート増幅は、変性および PCR 混合物 (ポリメラーゼを含まない) の添加後、血液を 60°C に加熱することによって行った。10分後にこの温度で酵素を添加し、PCR を 40 サイクル実施した。

【O 1 2 4】表 8 で使用する 10×緩衝液の組成：

緩衝液 1 :

- 200mM Tris, pH 8.8
- 100mM KCl

【O 1 2 5】緩衝液 2 :

- * • 60mM (NH₄)₂SO₄
- 20mM MgCl₂
- 1% Triton X-100
- 1 mg/ml のヌクレアーゼ不含有 BSA

【O 1 2 6】Vent 緩衝液 :

- 200mM Tris, pH 8.8
- 100mM KCl
- 100mM (NH₄)₂SO₄
- 20mM MgCl₂
- 1% Triton X-100

【O 1 2 7】表 8 の結果は、変性されているが精製されていない血液試料中の DNA を、4種の異なる DNA ポリメラーゼを使って増幅せしめることができること、および増幅が Taq ポリメラーゼの特別な性質に依存しないことを示す。

【O 1 2 8】

* 【表 8】

表 8

3種の異なる耐熱性DNAポリメラーゼを使った変性全血からのDNAのPCR増幅

ポリメラーゼ	ヘパリン処理血液		緩衝液	PCR
	5 μ l	20 μ l		
Pfu	+		1	++
Pfu		+	1	--
Pfu	+		2	+
Pfu		+	2	-
rTth	+		L 9	++
rTth		+	L 9	++
Vent	+		Vent(-BSA)	++
Vent		+	Vent(-BSA)	++
対照 (Pfv)	-	-	1	-

記号は表 2 と同じ意味を有する。

Pfu : ピロコッカス (*Pyrococcus*) のポリメラーゼ

rTth : テルムス・テルモフィラス (*Thermus thermophilus*) のポリメラーゼ

Vent : テルモコッカス・リトラリス (*Thermococcus litoralis*) のポリメラーゼ

【O 1 2 9】実施例 7 : 血液の遺伝性因子である第IX因子からのDNA配列の増幅

今までに与えた全ての実施例は HLA DQ α 遺伝子からの242 bpアンプリコンを同定することに基づいてい

る。従って、血液第IX因子の遺伝子からの長さ234 bpの断片について全血からの増幅を成し遂げた。

【O 1 3 0】X染色体上の劣性遺伝子である第IX因子中の欠損は、B型血友病 (クリスマス病) として知られる

血液疾患を引き起こす。單一コピー遺伝子であるこの遺伝性因子の配列は当業界で既知である [Yoshitake ら、*Biochemistry* 24: 3736-3750 (1985)]。エクソンdからの234 bp断片の増幅用のプライマーJR3とJR4の配列はJ. Reissら [Blut 60: 31-36 (1990)] から採用した。

【0131】5人のヘパリン処理血液それぞれ10μlおよび20μlを緩衝液L5中で変性せしめ、そして50μlの反応容量においてプライマーJR3とJR4を使って増幅させた(表9参照)。試験した全ての血液試料において234 bpの大きさの所望のアンプリコンが検出された。期*

*待のDNAバンドは20μlの血液では余り強くなく、主バンドに加えて幾つかの不特定の弱い副バンドが出現した。精製したDNAを用いたJR3/JR4のアニーリング温度のおよその決定を除いて、アッセイのそれ以上の最適化は行わなかった。

【0132】各々93°Cで30秒、55°Cで30秒および72°Cで90秒から成る37サイクルにおいて変性全血を増幅させた。その結果を表9に要約する。

【0133】

10 【表9】

表9
血液第IX因子の遺伝子からのDNA配列の増幅

ヘパリン処理血液		提供者	234 bpアンプリコンの合成
5 μl	20 μl		
+		1	++
+		2	++
+		3	++
+		4	++
+		5	++
+		1	+
+		2	++
+		3	++
+		4	++
+		5	++

負の対照

記号は表2と同じ意味を有する。

【0134】実施例8：乾燥血液試料からの増幅
しばしば不十分な設備を有する遠隔地において血液試料を収集しそしてそれを輸送することは、幾つかの困難を提供することがある。簡単な解決策は、濾紙上で血液試料をドリップしそして乾燥した試料を保存することである。ガスリー(Guthrie) スポットとして知られるこの種の試料は、免疫学的およびウイルス学的試験用の出発材料としての使用目的に長い寿命を有する (NCCLS Document LA4-A2, 1992年7月, 第2版)。

【0135】濾紙上で乾燥した血液試料は既にPCRにおいて利用されている。乾燥血液からDNAを溶出せしめ、部分精製し、そしてそれから特定の配列を増幅させる [I. Huangら、*Hum. Genet.* 84: 129-131 (1990) およ

※びNelsonら、*The Lancet* 336: 1451-1452 (1990)]。

【0136】ガスリースポットからの血液の直接増幅のために、5μlのEDTA血液とヘパリン血液を3種の異なる濾紙支持体上でドリップし、37°Cで2時間乾燥し、次いで切り取り、その濾紙片をL5緩衝液を用いる50μl PCRアッセイに導入し、そして20回の変性サイクル後に増幅させた。DQα遺伝子からの242 bpアンプリコンが検出可能であった。表10に示されるように、種々の濾紙を使った全ての試験試料が40回の増幅サイクル後に陽性結果を与えた。

【0137】

【表10】

表10

5 μl の乾燥血液を有する滤紙片上の血液試料のPCR増幅

滤紙	血液	PCR
ニトロセルロース (SS BA85/20; 45 μm)	EDTA処理血液	++
	ヘパリン処理血液	++
滤紙SS (ドットプロット用) "	EDTA処理血液	++
	ヘパリン処理血液	++
ナイロン膜 (Pall) "	EDTA処理血液	++
	ヘパリン処理血液	++

記号は表2と同じ意味を有する。

【0138】実施例9：新鮮な血液からの増幅

記載する全ての実験は、採血2日後に調製され-70°Cで保存されたBasle Cantonal Hospital の血液提供者からの凍結血液を使って実施した。更なる試験において、新鮮な血液一即ちまだ凍結されていないが抗凝固剤と混合されている血液一をPCRアッセイに使用することが簡単であることが示されるだろう。

【0139】試験条件は次のようにあった：各10 μl の新鮮な血液、ヘパリン処理血液およびクエン酸塩加血液（各々室温で2時間保存したもの）並びにEDTA処理血液（室温で24時間保存したもの）のPCRによる増幅を43サイクルに渡り実施した。指示した場合には-70°Cでの30分間の凍結が与えられた。10 μl の血液をH₂O、5 μl のL3緩衝液（ヘパリン処理血液とEDTA処理血液の場合）および5 μl のL10M緩衝液（クエン酸塩加血液の場合）で45 μl に增量させ、指示した場合には上述のごとく熱変性せしめ、次いでPCR混合物(5 μl)を添加し、PCRを開始した。

【0140】表11はその結果を要約する。何ら追加の変 * *

* 性または予備凍結段階を使わなくてもヘパリン処理血液 20 およびクエン酸塩加血液試料に対してPCRが効果的であることがわかった。EDTA処理血液らの細胞性DNAは直接増幅させることはできず、予備凍結段階が必要であった。ヘパリン処理血液およびクエン酸塩加血液の場合には、試料調製の異なる形態、即ち、凍結、凍結と変性（5サイクル）または凍結と20サイクルの変性（最後の形態の調製の結果は示していない）の間に全く相違を確認することができなかった。

【0141】しかしながら、新鮮なEDTA処理血液では、5サイクルのみの後よりも20サイクルのPCR前変性サイクルの後の方が強いシグナルが観察された。室温で5日間のヘパリン処理血液およびクエン酸塩加血液の保存後、PCR増幅は、調製を行わなかった試料または変性と凍結および変性なしの凍結を行った試料との間に全く相違を示さなかった。一方、EDTA処理血液の場合には顕著な相違が保持された（結果は示していない）。

【0142】

【表11】

表11
添加された抗凝固剤に対する新鮮な変性全血
または新鮮な未変性全血を用いたPCRの依存性

試料のPCR前処理	5変性サイクル (90°C/50°C)	PCR結果	
		242 bpアンブリコン	HLA DQ α
- = 室温			
+ = PCR前凍結 (-70°C)			
A) EDTA処理血液			
A	-	-	-
B	-	-	-
A	+	-	++
B	+	--	++
A	+	+	++
B	+	+	++
B) ヘパリン処理血液			
A	-	-	+
B	-	-	+
A	+	-	++
B	+	-	++
A	+	+	++
B	+	+	++
C) クエン酸塩加血液			
A	-	-	+
B	-	-	+
A	+	-	++
B	+	-	++
A	+	+	++
B	+	+	++
D) 対照			
C	+	+	-
D	+	+	++

PCR結果：- シグナル無し；+, ++ 増加する強度のシグナル

対照：CはEDTA処理ヒッジ血液であり；Dは70°Cで6か月間保存したヘパリン処理血液である。

【0143】実施例10：変性血清または変性血漿の存在下でのPCR

RNAウイルス、例えばC型肝炎ウイルスまたはHIVについての血液試料のスクリーニングのために、この種の感染性病原体のPCRアッセイが未精製の血液（または血清もしくは血漿）を使って直接実施できるとすれば技術的に有利であろう。これは、RNAの厄介な試料調製を排除し、試料の汚染の危険性を減らし、そして試料スクリーニングの自動化を容易にするだろう。

【0144】それぞれ10容量%および40容量%の変性血清またはEDTA、ヘパリンもしくはクエン酸塩処理血漿中の20 ng のヒトDNAの効率的増幅を与える緩衝液を探した。DQ α アンブリコンは、4種の試料全ておよび表11に示すような本発明に従った条件を使って増幅され

*た。40容量%の試料の場合、10容量%の試料の場合よりもPCR反応混合物中に高いマグネシウム濃度が必要であった。EDTA処理血液の場合のこの理由は、一般に、等モル量のマグネシウムがEDTAにより結合されるからである。即ち、1mMのEDTAは1mMのマグネシウムを結合する。遊離Mg²⁺濃度のみが増幅に効果を有する。EDTA処理血液のための好ましいMg²⁺濃度は、少なくとも1.4 mM (10容量%のEDTA処理血液) と約5.0 mM (80容量%のEDTA処理血液) の間のどこかである。

【0145】各場合違った方法で血液を調製した提供者からの5 μl (A) または20 μl (A) の変性血漿中の20 ng のヒトDNAの増幅を50 μl の反応容量で実施した。血漿をH₂O、5 μl の10×緩衝液1および1 μl のDNAで45 μl に調整し、20サイクルにおいて変性させ

た。次いでこの溶液 $5\mu l$ をPCR混合物に添加し、40サイクルに渡りDQα断片を増幅せしめた。その結果を表12に与える。

*

表12
それぞれ10容量% (A) および40容量% (B) の
変性血漿または血清の存在下でのPCR

	緩衝液	クエン酸塩加血漿	EDTA処理血漿	ヘパリン処理血漿	血清
(A)	L 5	+	-	++	++
	L 9	-	+	++	++
(B)	L 5M	++	+	+	+
	L 10M	-	+	-	+

記号は表2と同じ意味を有する。

【0147】実施例11：血清からのHBVの増幅
タンパク質により取り囲まれたDNA—この場合はB型肝炎ウイルスDNA—を、血清の存在下での精製DNAの増幅についての実施例10に従って、適当な緩衝液を使って効率的に検出した。このために、 $1\mu l$ あたり 1.5×10^7 個のHBウイルスのHBV計数を有する血清

(Abbott試験No. 2022: ウイルスHBV-DNA検出および定量用キットを使った計数の測定) を様々な希釈後

※に、HBV特異的プライマーMD122 およびMD123 を使って対照血清中で増幅せしめた。血清 $10\mu l$ を、L 5緩衝液を有する $50\mu l$ の反応容量中で変性させ、そしてPCR混合物を添加した後、40サイクルに渡り増幅させた。生成物をアガロースゲル上で分析した。その結果を表13に要約する。

【0148】

【表13】

表13

試料	PCRアッセイあたりの HBVゲノムの数	アンブリコン合成
1	1.5×10^6	++
2	1.5×10^5	++
3	1.5×10^4	++
4	1500	+
5	150	-
6	15	-
7	0 (対照血清)	-

記号は表2と同じ意味を有する。

【0149】この方法を使うと、1500個以上のHBVゲノムのDNA分子を含有する試料は、増幅されたDNAをアガロースゲル中で臭化エチジウムにより染色した後で目に見えるアンブリコンバンドを与えた。高感度同定方法、例えばアンブリコンと放射性標識プローブとのハイブリダイゼーションを使えば、このPCRアッセイはより一層感受性であることができる。

【0150】実施例12：未変性で且つ未精製の血清または血漿の存在下でのRNA-PCR

RNA-PCR増幅の基質として風疹ウイルスを選択し ★50

★た。風疹ウイルスはC型肝炎作用物質を含むトガウイルス科に属するウイルスである。ゲノムは10 kbを越える一本鎖RNAである。風疹ウイルスは逆転写酵素を全く含まない。HIVとは異なり、風疹ウイルスは増幅のどの段階においてもDNAから成ることはない。従って風疹ウイルスの調製物は全く風疹ウイルスDNAを含まない。

【0151】 $10\mu l$ のEDTA処理血漿または血清と反応混合物の最終容量の20容量%を変性させずにRNA-PCR混合物に導入した。風疹ウイルス調製物を予備精製せ

ずに直接逆転写酵素アッセイ (RTA) に使用し、そして得られたcDNAを風疹ウイルス特異的PCRのための出発基質として使用した。この方法では、RTA中のRNアーゼ阻害物質が重要である。

【0152】深層凍結血清および血漿を解凍し、各々10 μlを後述の混合物1(後述)で46 μlに希釈した。反応2と4については、混合物1中のRNasinとRNase遮断剤をH₂Oにより置き換えた。反応混合物を30~40 μlの鉱油で被膜し、そして42°Cにて30分間インキュベートした。95°Cに2分間加熱した後、4 μlの混合物2(後述)を添加し、DNAを40サイクルに渡り増幅させた。生成物をアガロースゲル上で分析した。その結果を下の表14に要約する。

【0153】混合物1:

- ・L8緩衝液 5 μl
- ・50%グリセリン 20 μl
- ・ランダムヘキサマー (1.65 μg/μl) 1 μl

- *・RNasin (40単位/μl) (Serva) 0.5 μl
- ・RNase遮断剤 (1単位/μl) (Stratagene) 0.5 μl
- ・dATP, dCTP, dGTPおよびdTTP (100 μM溶液) 各0.1 μl
- ・逆転写酵素 (MMLV; 200 単位/μl) 0.8 μl
- ・H₂O 6.8 μl
- ・風疹ウイルス M-33 (未精製凍結細胞残渣、ATCC受注番号VR-315) 1 μl

10 【0154】混合物2:

- ・風疹ウイルスプライマーRu2 およびRu3 (PCR条件に関する一般的観察を参照のこと) 各25ピコモル
- ・L8緩衝液 0.4 μl
- ・Taqポリメラーゼ 1.25単位
- ・H₂O 適量で4 μlにする。

【0155】

【表14】

表14

	血清 10 ml	血漿 10 ml	風疹 ウイルス	RNasein および RNase遮断剤	PCR
1	—	+	+	+	++
2	—	+	+	—	—
3	+	—	+	+	++
4	+	—	+	—	—

記号は表2と同じ意味を有する。

【0156】この実施例は、未変性の血清または血漿中でのPCRによりウイルスDNAを検出できることを示す。

【0157】

【配列表】

配列番号: 1

配列

GTGCTGCAGG TGTAAACTTG TACCA G

26

【0158】配列番号: 2

配列の長さ: 28

配列の型: 核酸

配列

CACGGATCCG GTAGCAGCGG TAGAGTTG

28

【0159】配列番号: 3

配列の長さ: 25

配列の型: 核酸

配列

AGGACCGGGC ATTCTAAGCA GTTTA

25

【0160】配列番号: 4

配列の長さ: 25

配列の型: 核酸

配列

◆鎖の数:一本鎖

トポロジー: 直鎖状

★ 配列の種類: Genomic DNA

☆鎖の数:一本鎖

トポロジー: 直鎖状

◆ 配列の種類: Genomic DNA

39

CAGTTTCAAC TTGTTTCAGA GGGAA

【0161】配列番号：5

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

CTCTCAATT TCTAGGGGAA

【0162】配列番号：6

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

AGCAGCCAGGA TGAAGAGGAA

【0163】配列番号：7

配列の長さ：24

配列の型：核酸

配列

TGCTTTGCC CATGGGACCT CGAG

【0164】配列番号：8

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列

GGCGAACACG CTCATCACGG T

40

25

* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：Genomic DNA

20

※ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：Genomic DNA

20

★ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：Genomic DNA

24

☆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：Genomic DNA

21